

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Anna Dobrodinská

Druhově specifické strukturní rozdíly spermií savců a funkce jejich klíčových proteinů během oplození

Species-specific structural differences of mammalian sperm and function of their key proteins during fertilization

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 15. 08. 2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Michaele Frolíkové, Ph.D., a konzultantce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D., za jejich vedení, cenné rady, ochotu a čas, který mi při vypracovávání této bakalářské práce věnovaly. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu při studiu.

Abstrakt

Oplození je proces, při kterém splývá samčí a samičí gameta, a dávají tak vzniknout novému organismu. Splynutí spermie s vajíčkem předchází několik nezbytných dějů, mezi které patří kapacitace, akrozomální reakce, vazba spermie na *zona pellucida* a oolemu a fúze membrán obou gamet. Řízení těchto dějů se účastní četné proteiny, které se nacházejí jak na spermiu, tak i na vajíčku. V průběhu oplození tyto proteiny plní buď jednu, nebo i více funkcí. U spermií savců nacházíme značné druhově specifické odlišnosti jak v jejich morfologii, tak i na proteinové úrovni. Komplexní pochopení mezidruhových rozdílů ve stavbě spermie a funkcích jejích klíčových proteinů přispěje k lepšímu porozumění procesu oplození, díky čemuž budeme v budoucnu schopni lépe diagnostikovat a následně léčit příčiny neplodnosti u lidí. Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o stavbě a klíčových proteinech spermie, které byly získány studiem jednotlivých modelových savčích organismů: býka, prasete, myši a člověka. Dále tato práce přináší jejich mezidruhové srovnání.

Klíčová slova: spermie, oplození, akrozomální reakce, kapacitace, proteiny spermie, býk, prase, myš, člověk

Abstract

The fertilization is a process during which a male and a female gamete merge so that a new organism may come into being. The sperm-egg fusion is preceded by several essential processes, such as the capacitation, acrosome reaction, the sperm binding to the *zona pellucida* and oolemma, and membrane fusion of the gametes. Numerous proteins, which are located in both sperm and eggs, are major actors in controlling the listed, essential processes. During the process of fertilization these proteins fulfil one or more functions. In mammalian sperm, significant species-specific differences may be found both in their morphology and at the protein level. A complex understanding of species-specific distinctions in sperm structure and functions of key sperm proteins would contribute to a better insight into the process of fertilization, thereby enabling us to better diagnose and subsequently treat the causes of infertility in humans. This bachelor's thesis summarizes the current knowledge of sperm structure and its key proteins that has been acquired through the studies of the following model mammal species: bull, boar, mouse, and human. Further, this thesis brings an interspecific comparison between the studied species.

Keywords: sperm, fertilization, acrosome reaction, capacitation, sperm proteins, bull, boar, mouse, human

Seznam zkratek

ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AR	akrozomální reakce
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CRISP	<i>cysteine-rich secretory protein</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HYAL5	<i>hyaluronoglucosaminidase 5</i>
Ig	imunoglobulin
PM	plazmatická membrána
SNARE	receptor pro synaptický protein
SPAM1	<i>sperm adhesion molecule 1</i>
ZAN	zonadhesin
ZP1	<i>zona pellucida</i> protein 1
ZP2	<i>zona pellucida</i> protein 2
ZP3	<i>zona pellucida</i> protein 3
ZP4	<i>zona pellucida</i> protein 4
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP3R	<i>zona pellucida</i> 3 receptor
ZPBP1	<i>zona pellucida binding protein 1</i>

Obsah

Úvod.....	1
Cíle práce.....	2
1. Stavba savčí spermie.....	3
1.1. Obecná stavba savčí spermie.....	3
1.1.1. Býk.....	6
1.1.2. Prase.....	6
1.1.3. Myš.....	6
1.1.4. Člověk.....	7
1.2. Srovnání.....	8
2. Funkce savčí spermie a jejích klíčových proteinů.....	9
2.1. Základní procesy předcházející fúzi gamet.....	9
2.2. Proteiny účastníci se řízení akrozomální reakce.....	11
2.3. Funkce proteinů při vazbě spermie na vajíčko.....	13
2.4. Proteiny účastníci se fúze gamet.....	17
Závěr.....	19
Seznam obrázků.....	21
Seznam tabulek.....	21
Seznam použité literatury.....	22

Úvod

Díky pohlavní reprodukci jsme schopni šířit své geny, a zajišťovat tak genetickou variabilitu. Abychom toho byli schopni, je zapotřebí dvou gamet: spermie a vajíčka.

Pro schopnost spermie savců oplodnit vajíčko je nezbytné, aby prošla v samičím reprodukčním traktu řadou biochemických změn, které probíhají v rámci kapacity a akrozomální reakce (Yanagimachi, 1981); tyto děje jsou velmi podrobně studovány. Součástí nejen těchto dvou dějů je fungování a interagování proteinů, které celý proces oplození řídí, a jsou tedy pro něj esenciální.

Pro studium savčích gamet, k němuž se využívají především myš, potkan, prase, býk či člověk, je zcela nutné charakterizovat mezidruhové rozdíly. Odlišnosti nacházíme především v morfologii spermie a fungování molekulárních dějů. Pro tuto práci byly z uvedených modelových druhů vybrány následující: (a) myš, (b) prase, (c) býk a (d) člověk.

Z modelových druhů jsou nejlépe prozkoumané gamety myši. Přes velké pokroky, které nám přineslo 21. století – např. nové poznatky o akrozomální reakci u myši (Jin et al., 2011) či charakterizaci několika klíčových molekul jako je receptor pro Izumo 1 Juno (Bianchi et al., 2014) – nám stále zůstávají některé mechanismy neobjasněné. Stejně tomu je i u dalších druhů. Studium mechanismů oplození je tudíž stále aktuální a nejnovější výzkumy se zaměřují především na jejich molekulární podstatu.

Nové poznatky v této oblasti mohou být v budoucnu aplikovány především při léčbě neplodnosti, jinak také sterility či infertility, jež bývá definována jako neschopnost otěhotnět po jednom roce pravidelného nechráněného pohlavního styku (Zegers-Hochschild et al., 2009). Tento narůstající problém se řeší metodami asistované reprodukce; stále však u několika procent párů nedokážeme určit, v čem obtíže s úspěšným oplozením spočívají. Důkazem prospěšnosti její potenciální vyšší úspěšnosti jsou tyto, byť nedokonalé, statistiky: V roce 2012 mělo 15 % (48,5 milionů) párů problémy s početím potomka (Mascarenhas, 2012). Počet neplodných mužů se celosvětově pohybuje okolo 30 miliónů, avšak bez dat pocházející z nejlidnatějších částí světa – Asie a Latinské Ameriky – proto jsou skutečná celosvětová data nepřesná a pohybují se od 2,5 % do 12 % (Agarwal, 2015). Roku 2010 bylo až 11 % žen ve Spojených státech amerických neplodných (Chandra, 2013).

Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky získané při studiu spermií a procesu oplození u vybraných (nejčastěji využívaných) savčích modelových druhů. Tato bakalářská práce se zaměřuje především na:

- (1) srovnání obecné stavby spermií jednotlivých druhů a vytyčení hlavních mezidruhových rozdílů a
- (2) popis klíčových proteinů účastnících se jednotlivých fází oplození se zaměřením na mezidruhové rozdíly.

1. Stavba savčí spermie

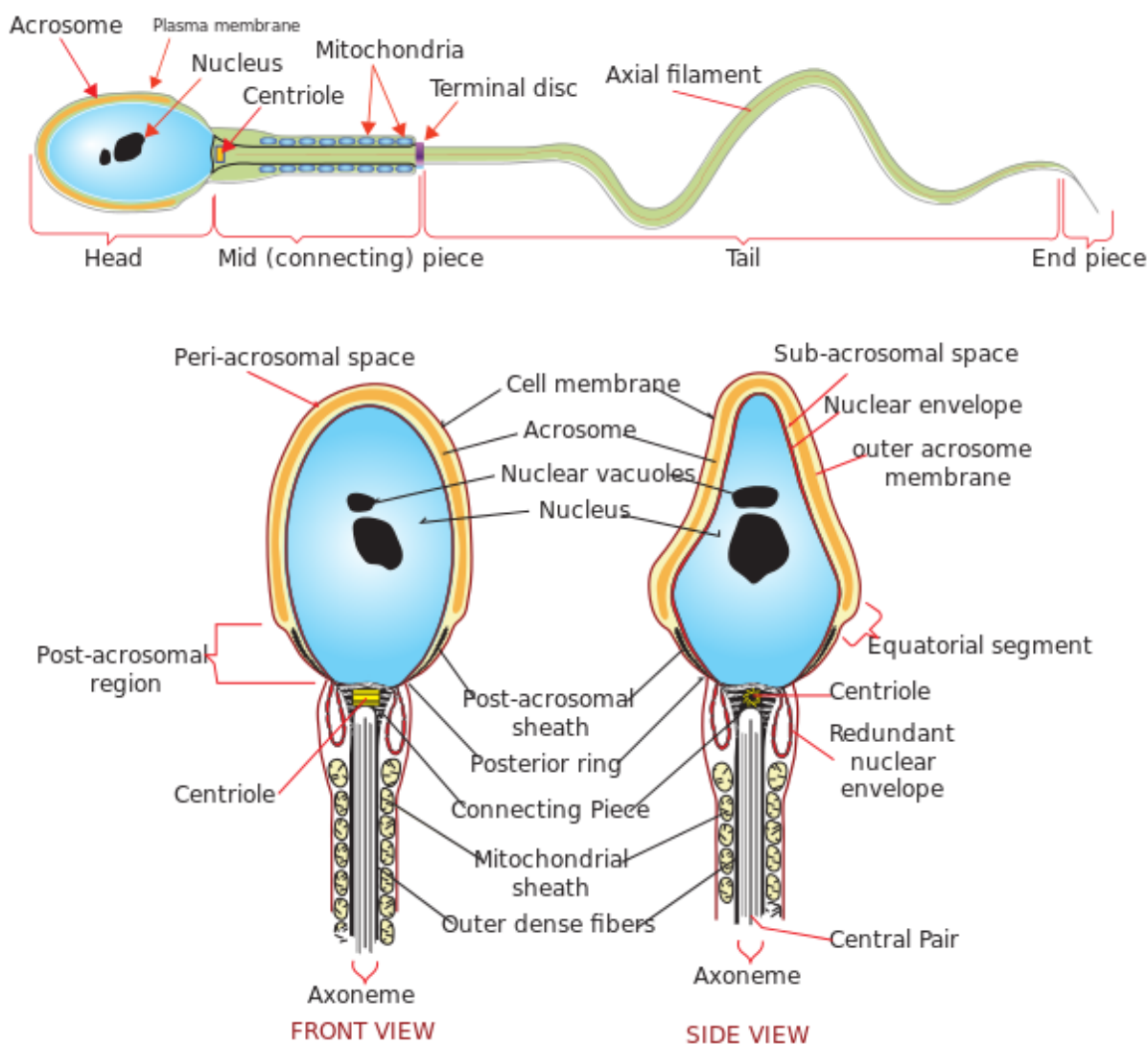
1.1. Obecná stavba savčí spermie

Spermie je samčí pohlavní buňka. Jedná se o vysoce specializovanou haploidní buňku, jejíž úkolem je oplodnit vajíčko. Zralá spermie se skládá ze tří částí, kterými jsou hlavička, krček a bičík. Spermie vznikají ve varlatech procesem nazývaným spermatogeneze. Vypuzovány jsou pomocí ejakulace společně s produkty prostaty a semenných váčků.

Na hlavičce savčí spermie jsou rozlišovány tři základní části: anteriorní část neboli apikální akrozom (AA), ekvatoriální segment (ES) a posteriorní část (PS). V hlavičce spermie se nachází jádro, ve kterém jsou situovány chromozomy (Fawcett, 1975). Jádro je jednou ze dvou organel, které hlavička spermie obsahuje, vyplňuje většinu jejího prostoru a udává její tvar. Druhou organelou je akrozom (viz níže) (Longo, 1987). Hlavičky spermií savců se mezi jednotlivými druhy morfologicky liší. Na základě tvaru hlavičky spermie dělíme do několika kategorií: (1) oválné, nacházející se například u kance; (2) kulaté, např. u člověka a primátů; (3) falciformní, např. u několika skupin hlodavců; a (4) hlavičky s velkým akrozomem, které se vyskytují například u veverky (Dvořáková et al., 2005).

Jádro spermie je nositelem DNA. Při spermiogenezi v jádře dochází k jaderným přestavbám, které vedou k inaktivaci DNA. Během tohoto procesu jsou chromozomální histony nahrazeny protaminy – proteiny s vysokým podílem argininu. Mezi cisteinovými zbytky proteinů se vytváří kovalentní disulfidické vazby, stabilizující chromatin a zajišťující vysokou míru kondenzace jaderné DNA (Talebi et al., 2013).

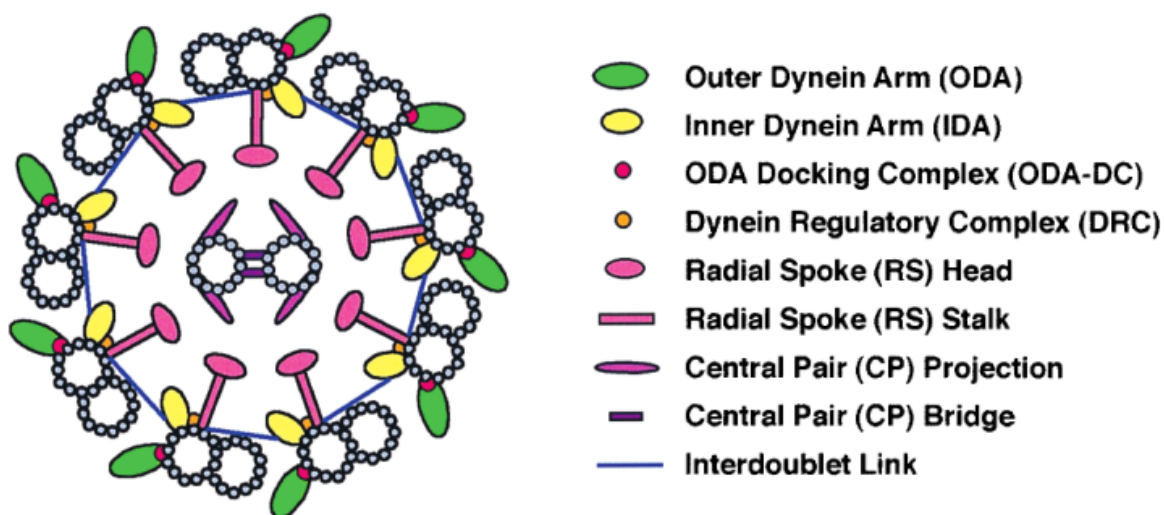
V anteriorní části hlavičky spermie se nachází akrozomální váček neboli akrozom. Akrozom je vysoce specializovaná organela, kterou najdeme pouze u spermií. Jedná se o sekreční organelu, jejíž původ se odvozuje od Golgiho komplexu (Tang et al., 1982). Nicméně poslední výzkumy ukazují, že biogeneze této organely je mnohem složitější (Berruti, 2016). Akrozomální váček spermie vzniká už v raném stádiu spermatogeneze a je podobný lysozomu. Struktura akrozomálního váčku je rozlišována na velký anteriorní segment a menší posteriorní segment, který nazýváme ekvatoriální segment proto, že se nachází ve střední části hlavičky spermie. Akrozom je definován akrozomální membránou, která je rozdělena na dvě části: na vnější akrozomální membránu (OAM – *outer acrosomal membrane*), situovanou pod plasmatickou membránou (PM) spermie, a vnitřní akrozomální membránu (IAM – *inner acrosomal membrane*), která se nachází okolo jádra. Akrozomální váček díky v něm obsaženým enzymům, které se uvolňují exocytózou při akrozomální reakci, umožňuje spermii projít glykoproteinový obal vajíčka (Austin a Bishop, 1958; Fléchon, 2016).



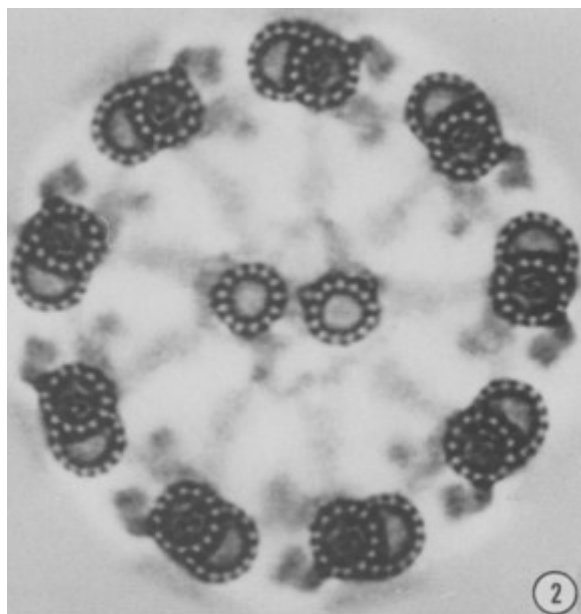
Obrázek 1: Schéma spermie (autor: Mariana Ruiz Villarreal, volné dílo)

Bičík, tvořící většinu délky spermie, zajišťuje pohyblivost spermie – motilitu. Osu bičíku tvoří axonema složená přibližně z 250 proteinů. Axonema se skládá ze dvou centrálních mikrotubulů, které se nazývají C1 a C2, obklopených devíti dvojicemi periferních mikrotubulů, které jsou po směru hodinových ručiček číslovány od 1 do 9. Mikrotubuly, ze kterých je bičík spermie tvořen, se skládají z polymerujících dimerů alfa a beta tubulinu (Cosson, 1996). Energii potřebnou k zajištění pohybu spermií zajišťují ATPasy – dyneiny. Na periferních mikrotubulech se nachází ramena dyneinů, dyneinový dokovací komplex, regulační komplex a radiální paprsky. Spojení mezi centrálními mikrotubuly se nazývá centrální párový most (Inaba, 2003).

Bičík spermie se skládá ze čtyř částí: (a) spojovací segment neboli krček, který bezprostředně přiléhá ke hlavičce; (b) střední část, která je nejsilnější částí spermie, a to díky mitochondriální pochvě tvořené seskupením mitochondrií do spirály a sloužící k zajištění energie pro pohyb spermie; (c) hlavní část, jež je svou délkou největší částí bičíku, chráněná vláknitým pláštěm; a (d) koncová část začínající v místě ukončení vláknitého pláště (Fawcett, 1975).



Obrázek 2: Schéma axonemy bičíku (Inaba, 2003)



Obrázek 3: Snímek axonemy (Afzelius et al., 1995)

1.1.1.Býk

Spermie býka dosahuje délky 75–80 μm . Tvar hlavičky je zploštělý a oválný. Hlavička měří až 10 μm a je 5 μm široká. Celková délka bičíku se pohybuje v rozmezí 65–70 μm , z toho střední část bičíku dosahuje 9–11 μm a hlavní část bičíku 36–54 μm . Akrozom, obsahující enzymy, díky kterým spermie proniká do vajíčka, kryje přední apikální polovinu jádra (Yanagimachi, 1981; Cummins a Woodall, 1985).

1.1.2.Prase

Spermie prasete jsou dosti podobné spermii ostatních kopytníků. Délkou dosahují 48–54 μm . Hlavička je dlouhá přibližně 6–8 μm a tvarově velmi podobná hlavičce spermie býka – jedná se tedy o oválný tvar. Celý bičík zaujímá délku 31–46 μm . Střední oddíl se poté uvádí v délce 10 μm a hlavní část v rozmezí 21–36 μm (Cummins a Woodall, 1985; Hancock, 1956; Kondracki et al., 2006). I přes velkou podobnost s hlavičkou spermie býka je prasečí akrozom větší (Yániz et al., 2016).

1.1.3.Myš

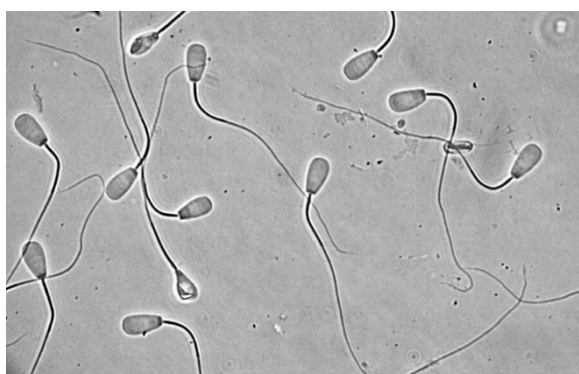
Celková délka spermie myši je 122–124 μm . Hlavička spermie z celé délky zabírá pouze 8 μm a bičík přibližně 116 μm . Střední oddíl bičíku zaujímá 21 μm . Nejdelší částí bičíku myší spermie je část hlavní, která měří přibližně 95 μm (Cummins a Woodall, 1985). Spermie myši se od spermii výše popsaných druhů liší zejména morfologií hlavičky, která má falciformní tvar, u kterého je akrozom situovaný na dorzální straně hlavičky. Na konci většiny spermii hlodavců se nachází apikální háček. Přítomnost apikálního háčku se dříve vysvětlovala tím, že se spermie myši díky němu dokáží lépe uchytit na *zona pellucida* vajíčka (Immler et al., 2007; Leblond a Clermont, 1952). U myšic byla potvrzena zcela jiná teorie. Apikální háčky některým druhům myšic také slouží k napojení na bičík, háček či jakoukoli část jiné spermie, a vytvářejí tak spermatické vláčky (Moore et al., 2002). Tato teorie zatím není zcela vysvětlena. U myši či potkanů je ale dokázáno, že tvorba těchto „vlaků“ pomocí apikálních háčků spermii nezajišťuje rychlejší pohyb oproti samostatně se pohybující spermii. Předpokládá se, že apikální háček spermii poskytuje více hydrodynamický tvar hlavičky (Gomez Montoto et al., 2011).

1.1.4.Člověk

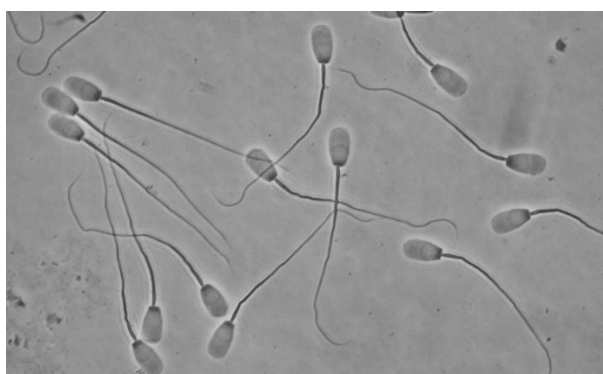
Jako standardní délka celé lidské spermie se uvádí přibližně 56–59 μm . Z čehož tvarově kulatá hlavička má délku 4,5 μm se šířkou 2,5–3,5 μm . Délka bičíku spermie je až 54 μm , z čehož střední oddíl zaujímá okolo 4–5 μm . Poté na hlavní část bičíku připadá část nejdelší, a to přibližně 46 μm (Cummins a Woodall, 1985). Amaral a kolektiv (2014) uvedli, že v lidské spermii bylo identifikováno až 6198 proteinů; podílí se na metabolismu, buněčném cyklu, apoptóze či metabolismu RNA; až 30 % identifikovaných proteinů je exprimováno ve varlatech.

	Celková délka	Délka hlavičky	Délka bičíku	Délka střední části bičíku	Délka hlavní části bičíku
Tur domácí (býk)	75–80 μm	10 μm	65–70 μm	9–11 μm	36–54 μm
Prase domácí/divoké	48–54 μm	6–8 μm	31–46 μm	10 μm	21–36 μm
Myš domácí	122–124 μm	8 μm	116 μm	21 μm	95 μm
Člověk	56–59 μm	4,5 μm	54 μm	4–5 μm	46 μm

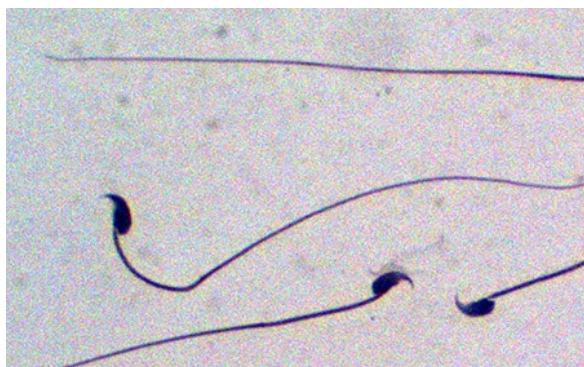
Tabulka 1: Přehled délek spermií srovnávaných druhů (zdroj dat: Cummins a Woodall, 1985; tabulka zpracována autorkou)



Obrázek 6: Spermie býka (University of Wisconsin, 2010a)



Obrázek 5: Spermie prasete (University of Wisconsin, 2010b)



Obrázek 7: Spermie myši (Ward, 2016)



Obrázek 4: Spermie člověka (Azim, 2015)

1.2. Srovnání

Spermie všech zkoumaných druhů jsou si velmi blízké svou stavbou, která byla popsána již v kapitole 1.1. Přesto je mezi nimi několik důležitých odlišností.

V první řadě mezi ně patří rozdílné délky spermií všech čtyř druhů. Jejich úplné délky se pohybují od 50 do 124 μm , z čehož nejdelší je spermie myši. U všech druhů platí, že nejmenší část z celkové délky zaujímá hlavička a naopak část nejdelší patří bičíku.

Tvarem hlavičky se nejvíce od ostatních zkoumaných druhů odlišuje spermie myši. Na rozdíl od spermie člověka, u kterého se vykytuje kulatý tvar hlavičky a je podobný tvaru oválnému, který se vykytuje u býka či prasete, u myši najdeme úplně odlišný falciformní (půlměsícovitý) tvar. Předpokládá se, že falciformní tvar hlavičky může být důsledek evoluční strategie – může jím být dosaženo lepší schopnosti a rychlosti při snaze oplodnit vajíčko.

Vývoj velikosti a tvaru hlavičky savčí spermie totiž obecně může být přizpůsoben evolučním strategiím, a to hlavně konkurenci mezi spermiemi. Nejen že kompetice spermií může způsobit zvýšení celkového počtu spermií, ale může rovněž vést k prodloužení spermií. Dochází tedy i k prodloužení střední části bičíku, kde se nachází mitochondriální pochva sloužící jako zdroj energie pro bičík, což má vliv na jejich schopnost produkovat více energie, tudíž být rychlejší a pravděpodobněji i úspěšnější. Schopnost spermie pohybovat se rychleji může být dosažena i pomocí lepšího, hydrodynamicky přizpůsobeného tvaru její hlavičky (Varea Sánchez et al., 2013; Cardullo a Baltz, 1991).

U akrozomů, nacházejících se u všech savčích spermií, nalézáme rozdíly, které závisí především na velikosti a tvaru hlavičky spermie. Mezi zkoumanými druhy můžeme pozorovat dva typy akrozomů. Jedná se o akrozom ve tvaru půlměsíce, který se vyskytuje u hlodavců, a kopíruje tedy falciformní tvar hlavičky, nebo akrozom ve tvaru čepičky, který se nachází u spermií ostatních savčích druhů. Základní struktura akrozomů zůstává u všech zkoumaných druhů stejná. Nebylo prokázáno, že odlišnosti u akrozomů mezi savčími druhy by měly následky na jejich fungování při akrozomální reakci či vazbě na *zona pellucida* (Abou-Haila a Tolsiani, 2003; Yániz et al., 2016).

2. Funkce savčí spermie a jejích klíčových proteinů

2.1. Základní procesy předcházející fúzi gamet

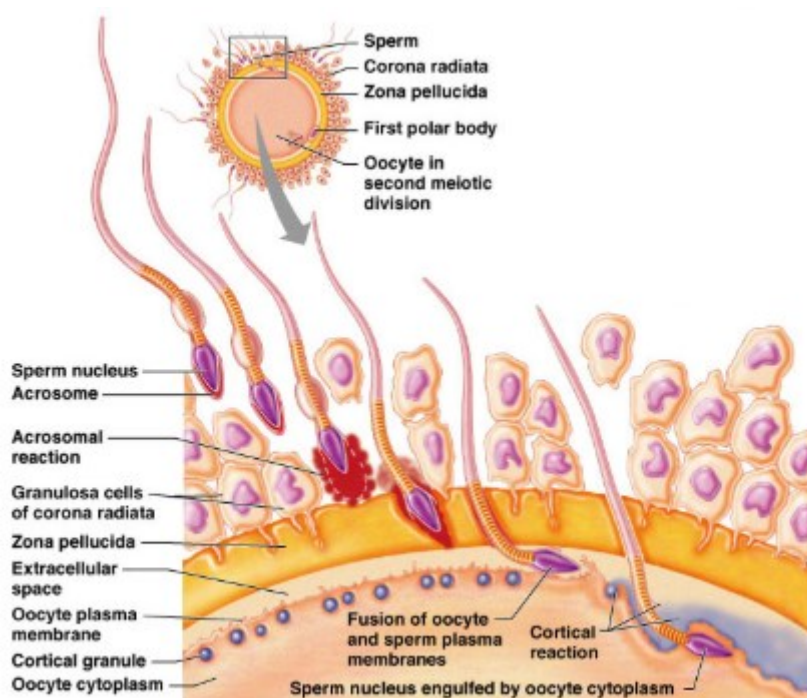
Proces, při kterém splynou dvě gamety – samčí a samičí – nazýváme oplození. K tomuto ději nejčastěji dochází v ampulárním oddílu vejcovodu. Spermie, které jsou při ejakulaci vpraveny do samičího reprodukčního traktu, se pohybují pomocí bičíku. Nejsou ovšem schopny ihned poté oplodnit vajíčko. Aby mohlo dojít k fúzi obou gamet a spermie byla připravena vajíčko oplodnit, musí dojít k procesům jako je kapacitace spermie a akrozomální reakce (AR) (Yanagimachi, 1981).

Kapacitace zahrnuje změny v intracelulárních složkách, ale i změny na plasmatické membráně spermie (Yanagimachi 1994). Dochází hlavně ke změnám ve fyziologických a biochemických vlastnostech spermie. Kapacitace se vyskytuje především u savčích spermií a je zcela nezbytná pro schopnost spermie oplodnit vajíčko. Kapacitace spermie probíhá v samičím reprodukčním traktu. Mezi hlavní změny při tomto procesu patří odstranění cholesterolu ze spermatické plasmatické membrány, což má za následek zvýšení fluidity membrány a její značnou reorganizaci. Dále dochází k hyperpolarizaci plasmatické membrány a tím aktivaci četných signálních molekul jako např. adenylátcyklázy – cAMP, což má za následek změny ve fosforylaci mnoha proteinů spermie. Během kapacitace je zásadní především nárůst tyrosinové fosforylace. Hladina intracelulárního pH se zvyšuje spolu se zvýšenou koncentrací hydrogenuhličitanu (HCO_3^-), což vede ke zvýšení koncentrace cAMP. Podstatná změna nastává v motilitě spermií – hyperaktivaci, ke které patří také orientovaná motilita k chemoatraktantům nacházejícím se v samičím reprodukčním traktu. Díky těmto změnám je později spermie schopna vázat se na *zona pellucida* a podstoupit akrozomální reakci (Hernández-González, 2006; Okabe, 2018; Harrison et al., 1996; Gadella et al., 2008).

Aby mohlo dojít k fúzi gamet, je třeba, aby spermie prostoupila extracelulární obaly vajíčka – vrstvu kumulárních buněk a *zona pellucida* – glykoproteinový obal. Než dojde k samotné penetraci *zona pellucida*, musí spermie projít morfologickou změnou – exocytózou akrozomu. Tento děj nazýváme akrozomální reakce (AR). Ještě do nedávna se bralo za obecný fakt, že AR je spuštěna a iniciována po kontaktu se *zona pellucida* a jejím proteinem ZP3. Od roku 2011 víme, že u několika savčích druhů hraje velmi důležitou roli při spuštění AR *in vivo* vrstva kumulárních buněk – *cumulus oophorus*. Jin et al. (2011) prokázali, že u myších spermií dochází k spuštění AR již při průchodu přes *cumulus oophorus* a že spermie po AR dále dokáží bez obtíží projít skrze *zona pellucida* a oplodnit vajíčko. V případě myších spermií se spekuluje o tom, že induktorem AR je hormon progesteron, který kumulární buňky sekretují.

AR lze u savců spermií navodit také *in vitro*, a to pomocí jak fyziologických (progesteron, *zona pellucida*), tak nefyziologických induktorů (např. *calcium ionophor*).

Během AR dochází ke kontaktu vnější akrozomální membrány se spermatickou plazmatickou membránou a vzniku jejich bodových fúzí (Sosa et al., 2015). Přiblížení těchto dvou membrán je umožněno díky rozpadu aktinových sítí, které se do této doby nacházely mezi oběma membránami, a tvořily tak fyzickou bariéru jejich fúze (Breitbart et al., 2005). Po fúzi membrán dochází k otevření velkého počtu fúzních pórů, které se rozšiřují, a to vede k uvolnění hybridních váčků. Během akrozomální exocytózy dochází kromě uvolnění intraakrozomálního obsahu do extracelulárního prostředí ještě k dalším klíčovým změnám. Mění se složení a topologie plazmatické membrány. Díky ztrátě vnější akrozomální membrány a velké části plazmatické je odkryta vnitřní akrozomální membrána. Jedná se o zásadní změny pro interakci a také fúzi spermií s oocytem (Sosa et al., 2015).



Obrázek 8: Schéma akrozomální reakce

(zdroj: www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/CH28_Fertilization.htm)

Během akrozomální reakce dochází také k relokaci proteinů, kdy se proteiny původně uzavřené v membráně akrozomu dostávají na povrch a jsou aktivně, pomocí aktinových sítí, přesouvány do ekvatoriální oblasti PM (Sosnik et al., 2009).

Enzymy nacházející se v akrozomu hrají roli při průniku spermie přes shluk kumulárních buněk *cumulus oophorus*. Přes tuto vrstvu se spermie dostává pomocí hyaluronidázy, která rozrušuje spojení kumulárních buněk spojených pomocí kyseliny hyaluronové (Yanagimachi, 1981). *Zona pellucida* spermie prostupuje úzkou stopou velikosti její hlavičky. Vzhledem k proběhlé fúzi membrán spermie prostupuje pouze s vnitřní akrozomální membránou. Na tomto průniku se podílí serinová proteáza – akrozin, který je aktivován z neaktivního proenzymu při spuštění akrozomální reakce (Allen a Green, 1997).

2.2. Proteiny účastníci se řízení akrozomální reakce

Spermie se na oocyt váží velmi specifickým způsobem. Na *zona pellucida* vajíčka byly nalezeny ligandy glykoproteinů, díky kterým se později mohou spermie na vajíčko navázat druhově specifickým způsobem. Jedná se o **ZP glykoproteiny**. Liší se výskytem i funkcí u různých savčích druhů (Bleil a Wassarman, 1990). Jak je již výše zmíněno, do nedávné doby se považovalo za obecný fakt, že za iniciaci AR jsou zodpovědné právě tyto ZP glykoproteiny, přesněji ZP3. Již v roce 2003 Therien a Manjunath uvedli, že za iniciaci AR může být zodpovědný hormon progesteron. Výzkum, který provedli Jin et al. (2011) jasně na myším modelu ukazuje, že spermie jsou schopné podstoupit AR už při průchodu vrstvou kumulárních buněk; ZP3 zůstává induktorem *in vitro* a jako spouštěč *in vivo* byl navržen progesteron, který je sekretován právě buňkami *cumulus oophorus*. Nicméně Gupta (2018) u člověka stále poukazuje na ZP glykoproteiny jako proteiny zodpovědné za akrozomální reakci, stejně jako už činili Chamberlin a Dean (1990).

Nejlépe prozkoumané ZP glykoproteiny jsou na myším modelu. U myši najdeme na *zona pellucida* glykoproteiny tři: ZP1, ZP2 a ZP3. Primární vazbu – vazbu spermie na vajíčko a (dnes pouze *in vitro*) AR iniciuje glykoprotein ZP3. Díky spolupráci akrozomální membrány s glykoproteinem myši ZP2 je spermii umožněno zůstat navázána na *zona pellucida*. Jedná se o sekundární vazbu. Glykoprotein ZP1 je důležitý hlavně z hlediska poskytování stability struktury *zona pellucida* pomocí zesíťování vláken ZP2 a ZP3 heterodimerů a na iniciaci akrozomální reakce či jiné interakci spermie s vajíčkem se nepodílí (Chiu et al., 2008). Navázání spermie na *zona pellucida* je možné pomocí N- a O-glykanů, které jsou připojené k ZP glykoproteinům (Yeste et al., 2017).

Na rozdíl od té myši lidská *zona pellucida* obsahuje čtyři glykoproteiny, a to ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Chiu et al., 2008). Za iniciaci akrozomální reakce je u člověka zodpovědných víc ZP glykoproteinů než u myši. Naprosto nezbytným krokem pro vyvolání AR je zde glykosylace těchto proteinů (Gupta, 2018). V roce 2008 bylo zřejmé, že za iniciaci AR jsou u člověka zodpovědné právě dva ZP glykoproteiny: ZP3 a ZP4 (Chiu et al., 2008; Gupta et al., 2009). V aktualizovaném průzkumu Gupta (2018) uvádí, že za vyvolání akrozomální reakce jsou zodpovědné nejen ZP3 a ZP4, ale i ZP1.

Prasečí a býčí *zona pellucida* obsahuje tři glykoproteiny: ZP2, ZP3 a ZP4. U býka, prasete nebo také psa glykoprotein ZP4 nahrazuje glykoprotein ZP1 (Gupta, 2011; Noguchi et al., 1994). I přes aktualizované informace z roku 2011, které ukazují, že myši spermie jsou schopny podstoupit AR již při průchodu vrstvou *cumulus oophorus*, výzkum od Tanihara et al. (2014) ukazuje, že u prasat funguje jako hlavní induktor AR *zona pellucida* a glykoproteiny, které obsahuje – jde především o ZP3 a ZP4.

Jak již bylo výše zmíněno, **progesteron**, který řadíme mezi fyziologické induktory, je hlavním kandidátem při iniciaci AR *in vivo*. Je sekretován kumulárními buňkami, které obklopují oocyt. Progesteron byl také studován v procesu spouštění kapacity spermií. Tato domněnka ale nebyla potvrzena (Therien a Manjunath, 2003). Progesteron je zastoupen v samičím traktu v mikromolárních koncentracích. U spermií myši, býků, prasat i lidí byl nalezen receptor pro progesteron, díky němuž se hormon dokáže navázat na plazmatickou membránu spermie. Nejedná se o receptor spojený s G-proteinem. Díky progesteronu se zvyšuje intracelulární vápník, což podporuje změnu v cytoskeletu, a to vede k vylití akrozomálního obsahu (Cheng et al., 1998; Patrat et al., 2000). Nejen že se progesteron tedy podílí na iniciaci AR, ale je také schopný stimulovat kapacitaci spermií u člověka (Dasgupta et al., 1994) i prasete (Barboni et al., 1995). U býků k tomuto nedochází, a je tudíž schopen stimulovat AR pouze u již kapacitovaných spermií (Therien, 2003). Podle Flormana et al. (2008) je progesteron při nižších koncentracích spíše zodpovědný za chemotaxi a motilitu spermií, než za indukci AR (Villanueva-Díaz et al., 1995).

Během AR hraje roli také protein **Cd46**. S výjimkou erytrocytů je u lidí exprimován všemi buňkami (Liszewski et al., 1994). U myši a jiných hlodavců je exprimován pouze na akrozomální membráně. Cd46 se vyskytuje přímo v interakci s $\beta 1$ integriny, nepřímo pak s tetraspaniny u lidí. U deficientních myši jsou obě pohlaví plodná, a dokonce se u knock-out samců vyskytoval vyšší počet mláďat než u *wild-type* samců. Předpokládá se, že hlavní funkce Cd46 je stabilizovat akrozomální membránu (Inoue et al., 2003; Frolíková et al., 2012; Klinovska et al., 2014).

2.3. Funkce proteinů při vazbě spermie na vajíčko

Vazba spermie na vajíčko je zajišťována ze strany vajíčka výše již zmíněnými ZP glykoproteiny. I u spermií bylo studováno mnoho kandidátních proteinů pro tuto funkci.

Nejlépe prostudované a popsané proteiny jsou na myším modelu. Jedním z nich je například **SED1**. SED1 je bílkovina u myši naprosto nezbytná pro zprostředkování vazby spermie na oocyt. Uvádí se, že s největší pravděpodobností protein SED1 rozeznává skupiny glykoproteinů ZP2 a ZP3 a váže se na jejich sacharidové zbytky. Vzhledem k funkci ZP2 u myši je překvapující spolupráce SED1 s glykoproteiny ZP2 *in vitro*. U ZP2 se u myši zpravidla jedná o sekundární vazbu, kdežto SED1 se podílí na vazbě primární. Tato bílkovina byla lokalizována na spermatické plazmatické membráně nad akrozomálním váčkem. Exprimována bývá ve spermatogenních buňkách (Ensslin a Shur, 2003). Myší SED1 je homologem pro prasečí protein p47 (Ensslin et al., 1995 a 1998).

Jedním z dalších proteinů, pomocí kterých se spermie dokáže navázat na vajíčko, je **sp56** (Cheng et al., 1994). Dnes je označován spíše jako **ZP3R**. Jedná se o lektin, který se váže na domény ZP3 právě proto, že obsahuje doménu pro rozpoznávání sacharidů (Reni et al., 2017).

Protein, jenž byl nalezen jak u myši, prasat, býků, tak i dalších savčích druhů, a jenž je schopný vázat se na ZP3 vajíčka se nazývá **β -1,4-galaktosyltransferasa** (GalT). Jedná se o intracelulární membránový protein, který se značně podílí na biosyntéze pomocí přenosu galaktózy na koncové zbytky N-acetylglukosaminu na rostoucím polysacharidovém řetězci (Lopez et al., 1989). Prasečí a býčí β -1,4-galaktosyltransferasa je lokalizována na periakrozomální oblasti, tedy anteriorní části hlavičky spermie (Larson a Miller, 1997; Fayrer-Hosken et al., 1991). U myši byl tento protein lokalizován na dorzální, anteriorní části hlavičky (Lopez a Shur, 1987).

Jak je již výše zmíněno v kapitole 2. 1., spermie musí projít přes vrstvu kumulárních buněk, které obklopují vajíčko. Spermii je tento průchod kumulárními buňkami umožněn díky adhezni molekule **SPAM1**, dříve nazývané **PH-20**. Jedná se o bifunkční protein plnící své funkce pomocí dvou domén, jež jsou umístěné na N-terminální (hyaluronidázová doména) a C-terminální (doména pro vazbu se *zona pellucida*) části proteinu. Tento protein byl nalezen u několika skupin savců, včetně člověka. Při oplození má nejen důležitou roli zajistit průnik spermie přes vrstvu buněk obklopujících vajíčko, ale podílí se také na vazbě s vajíčkem či na akrozomální exocytóze. V roce 2003 bylo také zjištěno, že se tento protein podílí na zrání spermií, a to hlavně u lidí (Evans et al., 2003). Bylo prokázáno, že u myši plní tuto funkci nejen

protein SPAM1, ale také HYAL5. Oba tyto proteiny mají u myši hyaluronidázovou aktivitu. Jsou zakotvené v akrozomální membráně či akrozomální plazmě. Tyto dva proteiny ovšem nejsou u myši nezbytné k oplození (Yoon et al., 2014). Baba et al. (2002) uvádí, že fertilita myši, jež postrádají protein SPAM1 se nezměnila; došlo ovšem k prodloužení doby, během které jsou spermie myši bez SPAM1 schopny oplodnit vajíčko. Jinak tomu je v případě prasete. U prasete, stejně jako u myši či člověka, bylo dokázáno, že se v jeho genomu vyskytuje pouze jedna kopie genu pro SPAM1. U všech je také exprimován v *testes*. Prasečí protein SPAM1 vykazoval vysoké podobnosti s lidským proteinem SPAM1, proto se předpokládá, že u prasete je nezbytný k oplození právě kvůli hyaluronidázové aktivitě, pomocí které spermie může proniknout vrstvou kumulárních buněk. Dále hraje roli v navázání spermie na *zona pellucida* vajíčka (Yoon et al. 2014). Z výzkumu Morina et al. (2010) vyplývá, že býčí forma proteinu SPAM1 se také podílí na vazbě *zona pellucida* se spermií, a to právě pomocí C-terminální části proteinu. U býků je stejně jako u myši lokalizován v akrozomálním obsahu či na vnější akrozomální membráně. Tento protein byl popsán nejen na býkovi, praseti, člověku či myši, ale také u lišky nebo koně (Morin et al., 2010).

Transmembránový protein, jenž se váže velmi druhově specifickým způsobem na *zona pellucida* vajíčka, se nazývá **zonadhesin** (ZAN). Tento protein byl úplně poprvé izolován a identifikován z prasečích spermií (Hardy a Garbers, 1994 a 1995). Zonadhesin se vytváří již za spermatogeneze a obsahuje více domén. Skot, prasata nebo primáti mají zonadhesin složený ze dvou či tří domén MAM, jedné domény podobající se mucinu, jedné neúplné a čtyř úplných domén D. Toto základní složení se ovšem liší například u myši v dalších 20 doménách D3. Zonadhesin je lokalizován v akrozomální matrix. Mezi druhy jsou si strukturou velice podobné. Značné rozdíly nacházíme ve složení aminokyselin (Tardif a Cormier, 2011; Gao a Garbers, 1998; Hunt et al., 2005). Tardif a kolektiv (2010) uvádějí, že spermie, jež mají deficit tohoto proteinu, jsou plodné; mají pouze sníženou druhovou specifitu při vazbě spermie na *zona pellucida*.

Mezi klíčové proteiny patří také serinová proteáza s trypsinovou specifitou, která je lokalizovaná v akrozomální matrix: **proacrosin** a jeho aktivní forma **acrosin**. Nejdříve je syntetizován jako neaktivní proenzym, který je během AR převeden na aktivní formu. Objeven byl u několika druhů savců, včetně člověka (Baba et al., 1989). Hlavní význam tohoto proteinu u myši je především při sekundární vazbě na ZP2; jedná se o silně iontovou vazbu (Howes et al., 2001). Acrosin ovšem zajišťuje hned několik dalších důležitých dějů během oplození. Nejenže má na starost sekundární vazbu na oocyt, podílí se také na průniku *zona pellucida* oocytu či napomáhá při AR (Rateman a Springer, 2008). Delece acrosinu u myši nezpůsobuje

neplodnost, dojde pouze k pozdějšímu proniknutí *zona pellucida*; acrosin tedy není nezbytně nutný v procesu oplození (Baba et al., 1994).

Protein **ZPBP1** neboli *zona pellucida binding protein 1*, známý také pod jménem IAM38 u býků nebo vnitřní akrozomální membránový protein. U prasečích spermií, u nichž byl poprvé tento protein objeven a popsán, je znám jako protein sp38. Jak už název napovídá, je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně. Zde je možno ho lokalizovat i po AR a po proniknutí do *zona pellucida*. Pomocí vazby na glykoproteinovou rodinu *zona pellucida* zajišťuje sekundární vazbu na oocyt. S acrosinem, který je mimo jiné také schopný inhibovat vazbu ZPBP1 na oocyt v raných fázích oplození, soupeří právě o tuto vazbu. Mimo důležitou funkci sekundární vazby, již ZPBP1 protein má, hraje také velice důležitou roli při formování akrozomu (Mori et al., 1993; Mori et al., 1995; Yu et al., 2009). Deficitní spermie vykazují nejen sterilitu, ale dochází u nich taktéž k defektům hlavičky a špatnému vývoji akrozomů (Yatsenko et al., 2012).

Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) je proteinová rodina, která se podílí na několika fázích oplození, například na kapacitaci, interakci spermie a oocyty či fúzi gamet. CRISP rodina je velmi bohatá na cysteiny (Roberts et al., 2006). Obsahují dvě domény, jež jsou složeny z 16 konzervovaných cysteinů: N-terminální doménu, složenou ze šesti cysteinových zbytků, a C-terminální doménu, obsahující 10 cysteinových zbytků. Tato proteinová rodina byla nalezena a popsána jen u obratlovců (Eberspaecher et al., 1995). Popsány u nich byli čtyři členové této proteinové rodiny, a to CRISP1, CRISP2, CRISP3 a CRISP4. Jako první byl charakterizován protein CRISP1 (Maldera et al., 2014). Většina savců, u nichž se vyskytují proteiny z rodiny CRISP, produkuje tři členy. U myši bylo ale zjištěno, že produkuje o jednoho člena více, tedy členy čtyři. Myši CRISP4 je homologem pro lidský CRISP1 a primární sekvence CRISP1 u myši je zase spíše podobná CRISP3 u člověka (Jalkanen et al., 2005). Je známa spolupráce mezi členy CRISP1 a CRISP2. Liší se pouze ve dvou aminokyselinách a jsou schopny interagovat se stejnými místy na oocyty (Busso et al., 2007). Pro CRISP1 se na oocyty nachází vazebná místa a díky N-terminální doméně je schopen se na *zona pellucida* navázat (Ellerman et al., 2006). Lidský hCRISP1 – epididymální protein – má na starosti vazbu spermie s vajíčkem pomocí interakce s lidskými ZP2, ZP3 a ZP4. U myši byli na proces vazby spermie s vajíčkem navrženi členové CRISP1 a CRISP4, kteří se vážou na myši ZP3 (Maldera et al., 2014). Pokud se u myších a lidských spermií vyskytují protilátky proti CRISP2, dochází k inhibici penetrace vajíčka, z čehož je patrná nutná kooperace členů této proteinové rodiny (Busso et al., 2007). Mimo reprodukční trakt se proteiny rodiny CRISP nacházejí v sekretech slinných žláz a toxinech několika druhů ještěrek či hadů (Roberts et al., 2006).

ADAMs je proteinová rodina účastníci se interakce a adheze gamet, jež následně vede k fúzi spermie s vaječnou membránou. Dříve byly známé jako MDC proteiny. Jedná se o buněčné povrchové proteiny membránově zakotvené; obsahují dezintegrin a metaloproteázovou doménu. Proteiny skupiny ADAM zahrnují čtyři domény: (a) proteolýzní doménu, (b) doménu adhezní, (c) fúzní doménu a (d) intracelulární signální doménu. Právě díky jejich fúzní doméně se předpokládá, že mají významnou funkci také během fúze gamet. Tyto proteiny jsou exprimované především ve varlatech (Sha et al., 2018). Rodina proteinů ADAM má u savčích druhů až 34 členů. U myši bylo identifikováno nejméně 34 genů, u lidí 26 genů. Více než polovina se nachází výlučně v mužských reprodukčních tkáních: varlatech či epididymis (Cho, 2012).

ADAM1 je často nazýván fertilin α a u lidí je označován jako tzv. pseudogen. Toto označení nese hlavně proto, že obsahuje předčasné stop kodony, a je tedy nefunkční (Jury et al., 1997; Sha et al., 2018). Jako fertilin β je nejčastěji uváděn ADAM2 (Evans et al., 1995). U fertilin β deficientních myši byla zjištěna inhibice vazby spermie na oolemu (Cho et al., 1998). Do vazby dvou gamet – mající klíčovou roli při oplození savců – jsou zahrnuty nejen proteiny ADAM1 a 2, ale také ADAM3, jenž je nezbytně nutný k myšimu procesu oplození. Jak již je výše zmíněno, protein ADAM1 je u lidských spermií nefunkční, proto se u člověka při vazbě na oocyt nejvíce uplatňuje dezintegrinová doména proteinu ADAM2. U myši bylo při delecí ADAM2 proteinu ukázáno, že dochází nejen k zabránění prezentace člena této proteinové rodiny ADAM1, ale také k myší neplodnosti (Cho et al., 1998). U býků byly pro interakci gamet nalezeny členové ADAM1b, ADAM2 a ADAM32, kteří se podílejí nejen na vazbě, ale také na motilitě býčích spermií v reprodukčním traktu samice či na penetraci *zona pellucida* (Selvaraju et al., 2017).

2.4. Proteiny účastníci se fúze gamet

Z předchozí kapitoly vyplývá, že je do oplození zahrnuto hned několik spolu fungujících proteinů. V této kapitole ale budou ukázáni pouze tři hlavní kandidáti, kteří jsou navrženi na funkce při fúzi gamet. Jedná se především o protein **Izumo 1**, jenž se nachází na spermii. Dále receptor proteinu Izumo 1, pojmenovaný **Juno**, jenž se nachází na vajíčku. Třetím kandidátem je vaječný protein **Cd9**. Tito tři hlavní kandidáti byli nalezeni u několika savčích druhů, včetně člověka (Chalbi et al., 2014).

Protein Izumo 1 je membránový glykoprotein imunoglobulinové rodiny typu 1. Izumo 1 byl popsán jako první ze své proteinové rodiny. Byl původně označen jako antigen, který byl rozpoznáván monoklonální protilátkou OBF13 (Okabe et al., 1987; Chalbi et al., 2014; Tanihara et al., 2014). Obsahuje jednu doménu imunoglobulinu (Ig) a N-koncovou část. Izumo 1 je exprimován ve varlatech a lokalizován na vnější akrozomální membráně, proto je také detekován až po AR (Ellerman et al., 2009). Kvůli jeho N-koncové oblasti se předpokládá, že Izumo 1 může mít také adhezivní funkci (Bianchi et al., 2014; Sosnik et al., 2009). Kim et al. (2013) se proto zabývali jeho adhezivní funkcí u prasat. Bylo zjištěno, že s největší pravděpodobností se Izumo 1 opravdu podílí také na sekundární vazbě na vaječnou membránu; jeho signál byl detekován v ekvatoriálním segmentu a také na vnitřní akrozomální membráně, která sekundární vazbu na oolemu zprostředkovává.

Skupina, jež je nadřazena proteinu Izumo 1, tedy proteinová rodina Izumo, se skládá ze čtyř bílkovin. Označují se čísly jedna až čtyři a vykazují mezi sebou určitou homologii. Členové jedna, dva a tři jsou exprimováni ve varlatech. Jedná se o transmembránové proteiny. Člen s číslem čtyři je exprimován nejen ve varlatech, ale i v jiných tkáních (Klinovska et al., 2014).

Při vytvoření Izumo 1 knock-out spermií bylo zjištěno, že jsou samci neplodní. Spermie jsou schopny projít AR, ale nedokáží podstoupit fúzi s vajíčkem a hromadí se v perivitelinním prostoru (Inoue et al., 2005).

Nedávné studie zjistili, že interakce proteinu Izumo 1 a jeho vazebného receptoru na vajíčku Juno nemá za následek samotnou fúzi gamet; důvodem je uvolnění receptoru Juno z vaječné membrány brzy po oplození. Nezbytná je ale adhezivní funkce interakce mezi Izumo 1 a Juno, která je klíčová při oplození (Bianchi et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že protein Izumo 1 neobsahuje žádnou fusogenní peptidovou doménu, nemůže sám zajistit fúzi gamet. Je tudíž mnohem pravděpodobnější, že spíše interaguje s ostatními proteiny a je součástí multiproteinového komplexu, jenž je zcela

nezbytný pro fúzní techniku membrán (Ellerman et al., 2009; Klinovska et al., 2014). Bylo prokázáno, že na tomto komplexu se Izumo 1 podílí také u býků (Kim, 2015).

Navrženo bylo několik proteinů, se kterými by protein Izumo 1 měl interagovat při fúzi gamet. Studován byl např. protein ACE3, ale bohužel byl později vyloučen z důvodu zmizení z membrány ihned po AR. Později byly zkoumány ještě další proteiny, jež by tuto funkci mohly splňovat (Klinovska et al., 2014).

Podrobně studován byl primární vazebný partner pro Izumo 1 – vaječný receptor Juno. Tento receptor byl objeven, identifikován a popsán poměrně nedávno (Bianchi et al., 2014). Jedná se o folátový receptor 4 a GPI-zakotvený extracelulární protein, známý také pod názvem Foltr4. Juno je velmi důležitým proteinem na vajíčku a jeho funkce zasahují až do blokace polyspermie. Je vysoce exprimován na neoplozených oocytech (Bianchi et al., 2014).

Při deficitu receptoru Juno dochází k neplodnosti samic. Jelikož se jedná o vaječný protein, samci při knock-outu zůstávají plodní (Chalbi et al., 2014).

O interakci proteinu Izumo 1 a receptoru Juno je pojednáno výše. Možným vysvětlením tam zmíněného vyvázání receptoru Juno z vaječné membrány brzy po oplození může být jeho účast při blokaci polyspermie. Juno byl z oolemy ztracen ve shodném načasování s membránovým blokem proti polyspermii (Bianchi et al., 2014; Bianchi a Wright, 2014).

Účast při fúzi gamet byla prokázána také u tetraspaninové transmembránové povrchové proteinové rodiny. Zde bude pojednáno o dvou jejích hojně studovaných členech: **Cd9** a **Cd81** (Klinovska et al., 2014). Nacházejí se u nich dva krátké C a N intracelulární koncové zbytky a čtyři transmembránové domény, jež oddělují dvě extracelulární domény různých velikostí (Yauch a Hemler, 2000). Cd9 je integrální membránový protein, který je často označován jako partner receptoru Juno (Chalbi et al., 2014). Pro vazbu Izumo 1 – Juno ale nezbytný není. Velmi podobný proteinu Cd9 je další člen z tetraspaninové rodiny: Cd81. Pro jeho podobnost a velmi častou interakci s proteinem Cd9 byl také navržen jako klíčový protein při fúzi gamet. Exprimován je na povrchu vajíčka a při provedení Cd81 knock-outu došlo jen k mírnému snížení plodnosti. Ve chvíli, kdy byly vymazány oba proteiny (Cd9 a Cd81), došlo k úplné neplodnosti. Je proto zřejmé, že Cd9 a Cd81 hrají společně velmi důležitou roli při fúzi gamet a vzájemně se nemohou zastoupit (Rubinstein et al., 2006; Klinovska et al., 2014; Chalbi et al., 2014). U obou výše zmíněných proteinů dochází při AR k přemístění směrem k ekvatoriálnímu segmentu hlavičky spermie. Na rozdíl od myších spermií, u nichž dochází k přemístění obou proteinů – tedy Cd9 a Cd81 –, je u lidí změna v lokalizaci patrná jen u proteinu Cd9, a stejně jako u býků se protein Cd81 nepřemísťuje (Frolíková et al., 2018; Jankovicova et al., 2016).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo: (a) vytvořit přehled současného stavu poznání o stavbách spermií čtyř vybraných modelových druhů (myš, prase, býk a člověk) s vytyčením hlavních druhových odlišností a (b) charakterizovat klíčové proteiny spermií účastníci se oplození.*

V práci jsou zdůrazněny hlavní rozdíly v obecné stavbě spermií, které se týkají především jejich délek a tvarů hlaviček. U myši, jejíž spermie je ze zkoumaných druhů jednoznačně nejdelší, se vyskytuje falciformní tvar hlavičky, kdežto spermie ostatních rozebíraných druhů mají hlavičky kulaté či oválné. Spermie býka, prasete i člověka si jsou svou délkou velmi podobné. U myši spermie je třeba zdůraznit háček, jenž je situován na apikální části hlavičky. Jeho funkce u hlodavců zatím nebyla plně objasněna. Jedná se proto o oblast s potenciálem pro budoucí výzkum.

Charakterizované proteiny jsou v této práci rozčleněny do tří skupin podle jejich funkce; nicméně ne všechny jednotlivé proteiny spadají pouze do jedné skupiny – např. proteiny z rodiny CRISP se angažují hned v několika fázích oplození.

Zcela zásadní mezidruhové odlišnosti lze nalézt u ZP glykoproteinů. Již v roce 2003 se mělo za to, že hormon progesteron může hrát důležitou roli v iniciaci AR. Stále však bylo obecně přijímáno, že ten, kdo iniciuje AR, je ZP3 glykoprotein, nacházející se na vajíčku. Až roku 2011 bylo prokázáno, že myši spermie podstupují AR již při průchodu buňkami *cumulus oophorus*, které sekretují právě progesteron. Nicméně u lidí nejnovější výzkumy z roku 2018 stále ukazují, že za iniciaci AR nesou zodpovědnost glykoproteiny ZP1, ZP3 a ZP4. U prasat ji nesou pouze dva, a to ZP3, ZP4.

U prasat si lze dále povšimnout rozdílů v lokalizaci β -1,4-galaktosyltransferasy, která je lokalizovaná stejně jako u býka, a to v anteriorní části hlavičky. Oproti tomu myš má tento protein lokalizovaný na dorzální, anteriorní části hlavičky.

Několik podstatných odlišností existuje i mezi proteiny v rámci proteinových rodin. Hlavní rozdíl mezi členy proteinové rodiny CRISP spočívá v jejich odlišném počtu u jednotlivých modelových druhů. Rozdíly jsou rovněž mezi členy proteinové rodiny ADAMs, která zajišťuje především sekundární vazbu na oolemu. U býků tuto funkci (a motilitu spermií) zajišťují ADAM1b, ADAM2 a ADAM32. U myši je mimo ADAM1 a ADAM2 v tomto smyslu

* K podrobnostem o níže shrnutých poznatcích, včetně jejich zdrojů, pochopitelně viz příslušné kapitoly této práce.

naprosto nezbytný také ADAM3. Funkci lidského pseudogenu ADAM1, kvůli jeho nefunkčnosti způsobené předčasnými terminačními kodony, nahrazuje ADAM2.

Jak z této práce vyplývá, při savčím oplození se na spermiích nachází i několik proteinů, jejichž deficiencie nijak nepřispívá k neúspěšnému závěru oplození, ale pouze způsobuje nepatrné změny, které mohou spermie znevýhodnit. Jedná se o zonadhesin, jehož absence vede ke snižování druhové specifity při vazbě na *zona pellucida*. Dále jde o acrosin, jehož delece způsobí pozdější průnik *zona pellucida* vajíčka. V neposlední řadě lze jmenovat myši SPAM1. Pokud není přítomen, dochází k prodloužení doby oplození vajíčka. Platí to však jen u myši; u ostatních zkoumaných druhů je tento protein nezbytně nutný při oplození. Myši výjimka spočívá v tom, že u ní byl nalezen protein HYAL5, který plní stejnou funkci jako SPAM1.

V neposlední řadě je nezbytné zmínit proteiny, které se účastní fúze gamet, tedy Izumo 1 a jeho vaječný receptor Juno, proteiny Cd9, Cd81 a Cd46.

U interakce Izumo 1 a Juno je nyní jisté, že nezahajuje samotnou fúzi gamet, a to proto, že se receptor Juno uvolňuje z vaječné membrány a putuje do perivitelinní oblasti. Z toho důvodu pro něj byla navržena další funkce: účast na bloku proti polyspermii. Izumo 1 stále zůstává jedním z hlavních proteinů způsobujících fúzi gamet; protože však neobsahuje fusogenní peptidovou doménu, jsou studovány další proteiny, jež by s Izumem 1 mohly interagovat po vyvázání receptoru Juno, a zajišťovat tak fúzi gamet.

U proteinů Cd9 a Cd81 bylo díky deleci zjištěno, že jsou nezbytné během oplození a vzájemně nezastupitelné. K mírnému snížení plodnosti došlo u odstranění proteinu Cd81, pokud ale došlo k vymazání obou, došlo k úplné neplodnosti. U myši se přemisťují oba výše zmíněné proteiny, a to v obou případech směrem k ekvatoriálnímu segmentu hlavičky spermie. U lidí a býků se při AR přemisťuje pouze protein Cd9.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma spermie	4
Obrázek 2: Schéma axonemy bičíku	5
Obrázek 3: Snímek axonemy	5
Obrázek 7: Spermie člověka	7
Obrázek 5: Spermie prasete.....	7
Obrázek 4: Spermie býka	7
Obrázek 6: Spermie myši	7
Obrázek 8: Schéma akrozomální reakce	10

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled délek spermií srovnávaných druhů	7
---	---

Seznam použité literatury

ABOU-HAILA, Aïda a Daulat TULSIANI. The Sperm Acrosome: Formation and Contents. In: TULSIANI, Daulat, ed. *Introduction to Mammalian Reproduction*. Boston: Springer US, 2003, s. 21-39. DOI: 10.1007/978-1-4615-0273-9_2. ISBN 978-1-4613-4998-3.

AFZELIUS, B.A., R. DALLAI, S. LANZAVECCHIA a P.L. BELLON. Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms. *Tissue and Cell*. 1995, **27**(3), 241-247. DOI: 10.1016/S0040-8166(95)80044-1. ISBN 10.1016/S0040-8166(95)80044-1. ISSN 00408166.

AGARWAL, Ashok, Aditi MULGUND, Alaa HAMADA a Michelle Renee CHYATTE. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015, **13**(1), 1-9. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1. ISSN 1477-7827

ALLEN, Catherine A. a David P. L. GREEN. The mammalian acrosome reaction: Gateway to sperm fusion with the oocyte?. *BioEssays*. 1997, **19**(3), 241-247. DOI: 10.1002/bies.950190310. ISSN 0265-9247.

AMARAL, Alexandra, Judit CASTILLO, João RAMALHO-SANTOS a Rafael OLIVA. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update*. 2014, **20**(1), 40-62. DOI: 10.1093/humupd/dmt046. ISSN 1460-2369.

AUSTIN, C. R. a M. W. H. BISHOP. Some Features of the Acrosome and Perforatorium in Mammalian Spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1958, **149**(935), 234-240. DOI: 10.1098/rspb.1958.0065. ISSN 0962-8452.

AZIM, Amr. Practical Approach to Male Infertility. In: *Fertility-concepts.nycivf.org* [online]. 2015 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <http://fertility-concepts.nycivf.org/male-infertility/practical-approach-to-male-infertility>

BABA, Daichi, Shin-ichi KASHIWABARA, Arata HONDA, Kazuo YAMAGATA, Qing WU, Masahito IKAWA, Masaru OKABE a Tadashi BABA. Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(33), 30310-30314. DOI: 10.1074/jbc.M204596200. ISSN 0021-9258.

BABA, Tadashi, Sadahiro AZUMA, Shin-ichi KASHIWABARA a Yutaka TOYODA. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269(50), 31845-31849. ISSN 1083-351X.

BABA, Tadashi, Shin-ichi KASHIWABAR, Ken WATANABE, et al. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264(20), 11920-11927. ISSN 1083-351X.

BARBONI, B, M MATTIOLI a E SEREN. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *Journal of Endocrinology*. 1995, **144**(1), 13-18. DOI: 10.1677/joe.0.1440013. ISSN 0022-0795.

BERRUTI, Giovanna. Towards defining an ‘origin’—The case for the mammalian acrosome. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2016, **59**, 46-53. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.01.013. ISSN 1084-9521.

BIANCHI, Enrica a Gavin J. WRIGHT. Izumo meets Juno. *Cell Cycle*. 2014, **13**(13), 2019-2020. DOI: 10.4161/cc.29461. ISSN 1538-4101.

BIANCHI, Enrica, Brendan DOE, David GOULDING a Gavin J. WRIGHT. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*. 2014, **518**(7497), 483-487. DOI: 10.1038/nature13203. ISSN 1476-4687

BLEIL, J. D. a P. M. WASSARMAN. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, **87**(14), 5563-5567. DOI: 10.1073/pnas.87.14.5563. ISSN 0027-8424.

BREITBART, H., G. COHEN a S. RUBINSTEIN. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*. 2005, **129**, 263-268. DOI: 10.1530/rep.1.00269. ISSN 1741-7899.

BUSSO, Dolores, Nadia M. GOLDWEIC, Masaru HAYASHI, Masanori KASAHARA a Patricia S. CUASNICÚ. Evidence for the Involvement of Testicular Protein CRISP2 in Mouse Sperm-Egg Fusion1. *Biology of Reproduction*. 2007, **76**(4), 701-708. DOI: 10.1095/biolreprod.106.056770. ISSN 0006-3363.

CARDULLO, Richard A. a Jay M. BALTZ. Metabolic regulation in mammalian sperm: Mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1991, 19(3), 180-188. DOI: 10.1002/cm.970190306. ISSN 0886-1544.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International*. 1996, 20(2), 83-94. DOI: 10.1006/cbir.1996.0012. ISSN 10656995

CUMMINS, J. M. a P. F. WOODALL. On mammalian sperm dimensions. *Reproduction*. 1985, 75(1), 153-175. DOI: 10.1530/jrf.0.0750153. ISSN 1470-1626.

DASGUPTA, S., C. O'TOOLE, C.L. MILLS a L.R. FRASER. Fertilization and early embryology: Effect of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosomal exocytosis. *Human Reproduction*. 1994, 9(11), 2103-2109. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138400. ISSN 1460-2350.

DVORAKOVA, K., H. D M MOORE, N. SEBKOVÁ a J. PALECEK. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*. 2005, 130(1), 61-69. DOI: 10.1530/rep.1.00549. ISSN 1470-1626.

EBERSPAECHER, Uwe, Dirk ROOSTERMAN, Jörn KRÄTZSCHMAR, et al. Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein crisp-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Molecular Reproduction and Development*. 1995, 42(2), 157-172. DOI: 10.1002/mrd.1080420205. ISSN 1040452X.

ELLERMAN, Diego A., Débora J. COHEN, Vanina G. DA ROS, Mauro M. MORGENFELD, Dolores BUSSO a Patricia S. CUASNICÚ. Sperm protein “DE” mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental Biology*. 2006, 297(1), 228-237. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.05.013. ISSN 00121606.

ELLERMAN, Diego A., Jimin PEI, Surabhi GUPTA, William J. SNELL, Diana MYLES a Paul PRIMAKOFF. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 2009, 76(12), 1188–1199. DOI: 10.1002/mrd.21092. ISSN 1098-2795.

ENSSLIN, Michael a Barry SHUR. Identification of Mouse Sperm SED1, a Bimotif EGF Repeat and Discoidin-Domain Protein Involved in Sperm-Egg Binding. *Cell*. 2003, 114(4), 405-417. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00643-3. ISSN 00928674.

ENSSLIN, Michael, Juan J. CALVETE, Hubert H. THOLE, Walter D. SIERRALTA, Knut ADERMANN, Libia SANZ a Edda TÖPFER-PETERSEN. Identification by Affinity Chromatography of Boar Sperm Membrane-Associated Proteins Bound to Immobilized Porcine Zona Pellucida. Mapping of the Phosphorylethanolamine-Binding Region of Spermadhesin AWN. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 1995, **376**(12), 733-738. DOI: 10.1515/bchm3.1995.376.12.733. ISSN 0177-3593.

ENSSLIN, Michael, Tanja VOGEL, Juan J. CALVETE, Hubert H. THOLE, Jorg SCHMIDTKE, Tsukasa MATSUDA a Edda TOPFER-PETERSEN. Molecular Cloning and Characterization of P47, a Novel Boar Sperm-Associated Zona Pellucida-Binding Protein Homologous to a Family of Mammalian Secretory Proteins. *Biology of Reproduction*. 1998, **58**, 1057-1064. ISSN 0006-3363.

EVANS, Eric A, Hong ZHANG a Patricia A MARTIN-DELEON. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003, **1**(1), 54-65. DOI: 10.1186/1477-7827-1-54. ISSN 14777827.

EVANS, J.P., R.M. SCHULTZ a G.S. KOPF. Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta. *Journal of Cell Science*. 1995, **108**(10), 3267-3278. ISSN 1477-9137.

FAWCETT, Don W. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*. 1975, **44**(2), 394-436. DOI: 10.1016/0012-1606(75)90411-X. ISSN 00121606.

FAYRER-HOSKEN, Richard A., A. B. CAUDLE a Barry D. SHUR. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 1991, **28**(1), 74-78. DOI: 10.1002/mrd.1080280112. ISSN 1040-452X.

FLÉCHON, Jacques-Edmond. The acrosome of eutherian mammals: revue littéraire mensuelle. *Cell and Tissue Research* [online]. 2016, [1923]-, **363**(1), 147-157 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1007/s00441-015-2238-0. ISSN 0302-766X.

FLORMAN, Harvey M., Melissa K. JUNGnickel a Keith A. SUTTON. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology*. 2008, **52**, 503-510. DOI: 10.1387/ijdb.082696hf. ISSN 1696-3547.

FROLIKOVA, Michaela, Pavla MANASKOVA-POSTLEROVA, Jiri CERNY, et al. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(4). DOI: 10.3390/ijms19041236. ISSN 1422-0067.

FROLÍKOVÁ, Michaela, Romana STOPKOVÁ, Jana ANTALÍKOVÁ, Peter M. JOHNSON, Pavel STOPKA a Kateřina DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ. Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica*. 2012, **61**(1), 84-94. DOI: 10.25225/fozo.v61.i1.a12.2012. ISSN 0139-7893.

GADELLA, Bart M., Pei-shiue TSAI, Arjen BOERKE a Ian A. BREWIS. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*. 2008, **52**(5-6), 473-480. DOI: 10.1387/ijdb.082583bg. ISSN 0214-6282.

GAO, Zeren a David L. GARBERS. Species Diversity in the Structure of Zonadhesin, a Sperm-specific Membrane Protein Containing Multiple Cell Adhesion Molecule-like Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**(6), 3415-3421. DOI: 10.1074/jbc.273.6.3415. ISSN 0021-9258.

GOMEZ MONTOTO, L., M. VAREA SANCHEZ, M. TOURMENTE, J. MARTIN-COELLO, J. J. LUQUE-LARENA, M. GOMENDIO a E. R. S. ROLDAN. Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents: head first. *Reproduction*. 2011, **142**(6), 819-830. DOI: 10.1530/REP-11-0232. ISSN 1470-1626.

GUPTA, Satish K. a Beena BHANDARI. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology*. 2011, **13**(1), 97–105. DOI: 10.1038/aja.2010.72. ISSN 1745-7262.

GUPTA, Satish K. The Human Egg's Zona Pellucida. Elsevier, 2018. *Current Topics in Developmental Biology*. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.01.001. ISSN 0070-2153.

GUPTA, Satish K., Pankaj BANSAL, Anasua GANGULY, Beena BHANDARI a Kausiki CHAKRABARTI. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*. 2009, **83**(1-2), 50-55. DOI: 10.1016/j.jri.2009.07.008. ISSN 01650378.

HANCOCK, J. L. THE MORPHOLOGY OF BOAR SPERMATOZOA. *Journal of the Royal Microscopical Society*. 1956, **76**(3), 84-97. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x. ISSN 03683974.

HARDY, Daniel M. a David L. GARBERS. A Sperm Membrane Protein That Binds in a Species-specific Manner to the Egg Extracellular Matrix Is Homologous to von Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, **270**(44), 26025-26028. DOI: 10.1074/jbc.270.44.26025. ISSN 0021-9258.

HARDY, Daniel M. a David L. GARBERS. Species-specific Binding of Sperm Proteins to the Extracellular Matrix (Zona Pellucida) of the Egg. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, **269**(29), 19000-19004. ISSN 0021-9258.

HARRISON, R.A.P., P.J.C. ASHWORTH a N.G.A. MILLER. Bicarbonate/CO₂, an Effector of Capacitation, Induces a Rapid and Reversible Change in the Lipid Architecture of Boar Sperm Plasma Membranes. *Molecular Reproduction And Development*. 1996, 45, 378-391. ISSN 1098-2795.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Enrique O., Julian SOSNIK, Jennifer EDWARDS, et al. Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-associated Hyperpolarization in Mouse Sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, **281**(9), 5623-5633. DOI: 10.1074/jbc.M508172200. ISSN 0021-9258.

HOWES, Elizabeth, John C. PASCALL, Wolfgang ENGEL a Roy JONES. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of Cell Science*. 2001, **114**, 4127-4136. ISSN 0021-9533.

HUNT, Peter ND, Michael D WILSON, Kristian R VON SCHALBURG, William S DAVIDSON a Ben F KOOP. Expression and genomic organization of zonadhesin-like genes in three species of fish give insight into the evolutionary history of a mosaic protein. *BMC Genomics*. 2005, **6**(165), 4-15. DOI: 10.1186/1471-2164-6-165. ISSN 14712164.

CHALBI, M., V. BARRAUD-LANGE, B. RAVAUX, et al. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*. 2014, **141**, 732-737. DOI: 10.1242/dev.111534. ISSN 1477-9129.

CHAMBERLIN, M. E. a J. DEAN. Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, 87(16), 6014-6018. DOI: 10.1073/pnas.87.16.6014. ISSN 0027-8424.

CHANDRA, Anjani, Casey E. COPEN a Elizabeth Hervey STEPHEN. Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth. *National health statistics reports*. 2013, **67**, 1-18.

CHENG, A., T. LE, M. PALACIOS, L.H. BOOKBINDER, P.M. WASSARMAN, F. SUZUKI a J.D. BIER. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *The Journal of Cell Biology*. 1994, **125**(4), 867-878. DOI: 10.1083/jcb.125.4.867. ISBN 0021-9525. ISSN 0021-9525.

CHENG, Feng-Pang, Barend M. GADELLA, Wim F. VOORHOUT, Alireza FAZELI, Mart M. BEVERS a Ben COLENBRANDER. Progesterone-Induced Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa Is Mediated by a Plasma Membrane Progesterone Receptor. *Biology of Reproduction*. 1998, **59**(4), 733-742. DOI: 10.1095/biolreprod59.4.733. ISSN 0006-3363.

CHIU, Philip C.N., Ben S.T. WONG, Man-Kin CHUNG, et al. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2008, **79**(5), 869-877. DOI: 10.1095/biolreprod.108.069344. ISSN 0006-3363.

CHO, Chunghee, Donna O'DELL BUNCH, Jean-Emmanuel FAURE, Eugenia H. GOULDING, Edward M. EDDY, Paul PRIMAKOFF a Diana G. MYLES. Fertilization Defects in Sperm from Mice Lacking Fertilin β . *Science*. 1998, 281(5384), 1857-1859. DOI: 10.1126/science.281.5384.1857.

CHO, Chunghee, Donna O'Dell BUNCH, Jean-Emmanuel FAURE, Eugenia H. GOULDING, Edward M. EDDY, Paul PRIMAKOFF a Diana G. MYLES. Fertilization Defects in Sperm from Mice Lacking Fertilin β . *Science*. 1998, 281(5384), 1857-1859. DOI: 10.1126/science.281.5384.1857. ISSN 1095-9203.

CHO, Chunghee. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. *Nature Reviews Urology*. 2012, **9**(10), 550-560. DOI: 10.1038/nrurol.2012.167. ISSN 1759-4812.

IMMLER, Simone, Harry D.M. MOORE, William G. BREED, Tim R. BIRKHEAD a Tom PIZZARI. By Hook or by Crook? Morphometry, Competition and Cooperation in Rodent Sperm. *PLOS ONE*. 2007, **2**(1), 1-5. DOI: 10.1371/journal.pone.0000170. ISSN 1932-6203.

INABA, Kazuo. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*. 2003, **20**(9), 1043-1056. DOI: 10.2108/zsj.20.1043. ISSN 0289-0003.

INOUE, N., M. IKAWA, T. NAKANISHI, M. MATSUMOTO, M. NOMURA, T. SEYA a M. OKABE. Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, **23**(7), 2614-2622. DOI: 10.1128/MCB.23.7.2614-2622.2003. ISSN 0270-7306.

INOUE, Naokazu, Masahito IKAWA, Ayako ISOTANI a Masaru OKABE. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005, **434**(7030), 234-238. DOI: 10.1038/nature03362. ISSN 0028-0836.

JALKANEN, Jenni, Ilpo HUHTANIEMI a Matti POUTANEN. Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (CRISP4): A Member of the Crisp Family Exclusively Expressed in the Epididymis in an Androgen-Dependent Manner¹. *Biology of Reproduction*. 2005, **72**(5), 1268-1274. DOI: 10.1095/biolreprod.104.035758. ISSN 0006-3363.

JANKOVICOVA, Jana, Michaela FROLIKOVA, Natasa SEBKOVA, et al. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction*. 2016, **152**(6), 785-793. DOI: 10.1530/REP-16-0304. ISSN 1470-1626.

JIN, M., E. FUJIWARA, Y. KAKIUCHI, M. OKABE, Y. SATOUH, S. A. BABA, K. CHIBA a N. HIROHASHI. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, **108**(12), 4892–4896. DOI: 10.1073/pnas.1018202108. ISSN 1091-6490.

JURY, Jennifer A., Jan FRAYNE a Len HALL. The human fertilin α gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochemical Journal*. 1997, **321**(3), 577-581. DOI: 10.1042/bj3210577. ISSN 0264-6021.

KIM, E., J-S. KIM, Y. LEE, et al. Molecular Cloning, Characterization of Porcine IZUMO1, an IgSF Family Member. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013, **48**(1), 90-97. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02037.x. ISSN 09366768.

KIM, Ekyune. Molecular cloning and characterization of Izumo1 gene from bovine testis. *Journal of Animal Science and Technology*. 2015, **56**(16), 1-7. DOI: 10.1186/s40781-015-0049-1. ISSN 055-0391.

KLINOVSKA, Karolina, Natasa SEBKOVÁ a Katerina DVORAKOVA-HORTOVA. Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(6), 10652-10668. DOI: 10.3390/ijms150610652. ISSN 1422-0067.

KONDRACKI, Stanisław, Anna WYSOKIŃSKA, Dorota BANASZEWSKA a Joanna CHOMICZ. Sperm morphology of cattle and domestic pigs. *Reproductive biology*. 2006, **6**(2), 99-104. ISSN 1642-431X.

LARSON, Jennine L. a David J. MILLER. Sperm from a Variety of Mammalian Species Express β 1,4-Galactosyltransferase on Their Surface. *Biology of Reproduction*. 1997, **57**, 442-453. ISSN 1529-7268.

LEBLOND, C. P. a Y. CLERMONT. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid? technique. *American Journal of Anatomy*. 1952, **90**(2), 167-215. DOI: 10.1002/aja.1000900202. ISSN 0002-9106.

LISZEWSKI, M. Kathryn, Indriati TEDJA a John P. ATKINSON. Membrane Cofactor Protein (CD46) of Complement. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1994, **269**(14), 10776-10779. ISSN 1083-351X.

LONGO, F. J. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *The Journal of Cell Biology*. 1987, **105**(3), 1105-1120. DOI: 10.1083/jcb.105.3.1105. ISSN 0021-9525.

LOPEZ, L C, C M MAILLET, K OLESZKOWICZ a B D SHUR. Cell surface and Golgi pools of beta-1,4-galactosyltransferase are differentially regulated during embryonal carcinoma cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 1989, **9**(6), 2370-2377. DOI: 10.1128/MCB.9.6.2370. ISSN 0270-7306.

LOPEZ, L. C. a B.D. SHUR. Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *The Journal of Cell Biology*. 1987, **105**(4), 1663-1670. DOI: 10.1083/jcb.105.4.1663. ISBN 0021-9525. ISSN 0021-9525.

MALDERA, J. A., M. WEIGEL MUNOZ, M. CHIRINOS, et al. Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Molecular Human Reproduction*. 2014, **20**(4), 341–349. ISSN 1360-9947.

MASCARENHAS, Maya N., Seth R. FLAXMAN, Ties BOERMA, Sheryl VANDERPOEL, Gretchen A. STEVENS a Nicola LOW. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*. 2012, **9**(12), 1-12. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001356. ISSN 1549-1676

MOORE, Harry, Katerina DVORAKOVA, Nicholas JENKINS a William BREED. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*. 2002, 418(6894), 174-177. DOI: 10.1038/nature00832. ISSN 0028-0836.

MORI, E., T. BABA, A. IWAMATSU a T. MORI. Purification and Characterization of a 38-kDa Protein, sp38, with Zona Pellucida-Binding Property from Porcine Epididymal Sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993, **196**(1), 196-202. DOI: 10.1006/bbrc.1993.2234. ISSN 0006291X.

MORI, Etsuko, Shin-ichi KASHIWABARA, Tadashi BABA, Yoshimasa INAGAKI a Tsuneatsu MORI. Amino Acid Sequences of Porcine Sp38 and Proacrosin Required for Binding to the Zona Pellucida. *Developmental Biology*. 1995, **168**(2), 575-583. DOI: 10.1006/dbio.1995.1103. ISSN 00121606.

MORIN, Guillaume, Robert SULLIVAN, Isabelle LAFLAMME, Claude ROBERT a Pierre LECLERC. SPAM1 Isoforms from Two Tissue Origins Are Differentially Localized Within Ejaculated Bull Sperm Membranes and Have Different Roles During Fertilization1. *Biology of Reproduction*. 2010, **82**(2), 271-281. DOI: 10.1095/biolreprod.109.079582. ISSN 0006-3363.

NOGUCHI, S, N YONEZAWA, T KATSUMATA, K HASHIZUME, M KUWAYAMA, S HAMANO, S WATANABE a M NAKANO. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1994, **1201**(1), 7-14. DOI: 10.1016/0304-4165(94)90143-0. ISSN 03044165.

OKABE, Masaru, Toshiyuki ADACHI, Katsuaki TAKADA, Hiroshi ODA, Mitsuro YAGASAKI, Yasuhiro KOHAMA a Tsutomu MIMURA. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of Reproductive Immunology*. 1987, **11**(2), 91-100. DOI: 10.1016/0165-0378(87)90014-3. ISSN 01650378.

OKABE, Masaru. Sperm-egg interaction and fertilization: past, present, and future. *Biology of Reproduction*. 2018. DOI: 10.1093/biolre/ioy028. ISSN 0006-3363.

PATRAT, Catherine, Catherine SERRES a Pierre JOUANNET. Induction of a Sodium Ion Influx by Progesterone in Human Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*. 2000, **62**(5), 1380-1386. DOI: 10.1095/biolreprod62.5.1380. ISSN 0006-3363.

RATERMAN, Denise a Mark S. SPRINGER. The molecular evolution of acrosin in placental mammals. *Molecular Reproduction and Development*. 2008, **75**(7), 1196-1207. DOI: 10.1002/mrd.20868. ISSN 1040452X.

RENI, Kurniati, Utomo DIDIK HUSWO, Rahayu SRI, Widodo WIDODO a Sumitro SUTIMAN BAMBANG. Molecular interaction of zp3 to zp3r reveals a cross-species fertilization mechanism. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2017, **6**(3), 116-120. DOI: 10.12980/apjr.6.20170304. ISSN 23050500.

ROBERTS, Kenneth P., Kathy M. ENSRUD, Joseph L. WOOTERS, Michael A. NOLAN, Daniel S. JOHNSTON a David W. HAMILTON. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006, **250**(1-2), 122-127. DOI: 10.1016/j.mce.2005.12.034. ISSN 0303-7207.

RUBINSTEIN, Eric, Ahmed ZIYYAT, Michel PRENANT, Edyta WROBEL, Jean-Philippe WOLF, Shoshana LEVY, François LE NAOUR a Claude BOUCHEIX. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology*. 2006, **290**(2), 351-358. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.11.031. ISSN 00121606.

SEBKOVA, N., L. DED, K. VESELA a K. DVORAKOVA-HORTOVA. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction*. 2014, **147**, 231-240. DOI: 10.1530/REP-13-0193. ISSN 1741-7899.

SELVARAJU, Sellappan, Sivashanmugam PARTHIPAN, Lakshminarayana SOMASHEKAR, Atul P KOLTE, B. KRISHNAN BINSILA, Arunachalam ARANGASAMY

a Janivara Parameshwaraiah RAVINDRA. Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 1-14. DOI: 10.1038/srep42392. ISSN 2045-2322.

SHA, Yan-Wei, Xiaohui XU, Zhi-Yong JI, et al. Sperm-egg fusion disorder in a Chinese male patient was associated with a rare ADAM20 variant. *Oncotarget*. 2018, **9**(2), 2086-2091. DOI: 10.18632/oncotarget.23331. ISSN 1949-2553.

SOSA, C.M., M.A. PAVAROTTI, M.N. ZANETTI, F.C.M. ZOPPINO, G.A. DE BLAS a L.S. MAYORGA. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Molecular Human Reproduction*. 2015, **21**(3), 244–254. DOI: 10.1093/molehr/gau110. ISSN 1460-2407.

SOSNIK, J., P. V. MIRANDA, N. A. SPIRIDONOV, S.-Y. YOON, R. A. FISSORE, G. R. JOHNSON a P. E. VISCONTI. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *Journal of Cell Science*. 2009, **122**(15), 2741-2749. DOI: 10.1242/jcs.047225. ISSN 0021-9533.

TALEBI, Ali Reza, Mohammad Ali KHALILI, Serajodin VAHIDI, Jalal GHASEMZADEH a Nasim TABIBNEJAD. Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 2013, **36**(2), 140-146. DOI: 10.1179/2045772312Y.0000000055. ISSN 1079-0268.

TANG, X. M., M. F. LALLI a Y. CLERMONT. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy*. 1982, **163**(4), 283-294. DOI: 10.1002/aja.1001630402. ISSN 0002-9106.

TANIHARA, Fuminori, Michiko NAKAI, Nguyen Thi MEN, Noriko KATO, Hiroyuki KANEKO, Junko NOGUCHI, Takeshige OTOI a Kazuhiro KIKUCHI. Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor ‘IZUMO’ during in vitro fertilization in pigs. *Animal Science Journal*. 2014, **85**, 395–404. DOI: 10.1111/asj.12164. ISSN 1740-0929.

TARDIF, Steve a Nathaly CORMIER. Role of zonadhesin during sperm–egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2011, **17**(11), 661-668. DOI: 10.1093/molehr/gar039. ISSN 1460-2407.

TARDIF, Steve, Michael D. WILSON, Rebecca WAGNER, et al. Zonadhesin Is Essential for Species Specificity of Sperm Adhesion to the Egg Zona Pellucida. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, **285**(32), 24863-24870. DOI: 10.1074/jbc.M110.123125. ISSN 0021-9258.

THERIEN, I. a Puttaswamy MANJUNATH. Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*. 2003, **69**(4), 1408-1415. DOI: 10.1095/biolreprod.103.017855. ISSN 0006-3363.

UNIVERSITY OF WISCONSIN. Bull Sperm. In: *Wisc.edu* [online]. 2010a [cit. 2018-02-14]. Dostupné z:

http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/procedures/sperm/bull_morp/bull_morphology.html

UNIVERSITY OF WISCONSIN. Pig Sperm. In: *Wisc.edu* [online]. 2010b [cit. 2018-02-14]. Dostupné z:

http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/procedures/sperm/pig_sperm_morp/pig_morphology.html

VAREA SÁNCHEZ, María, Markus BASTIR a Eduardo R. S. ROLDAN. Geometric Morphometrics of Rodent Sperm Head Shape. *PLOS One*. 2013, **8**(11), 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0080607. ISSN 1932-6203.

VILLANUEVA-DÍAZ, Carlos, Joel ARIAS-MARTÍNEZ, Luisa BERMEJO-MARTÍNEZ a Felipe VADILLO-ORTEGA. Progesterone induces human sperm Chemotaxis. *Fertility and Sterility*. 1995, **64**(6), 1183-1188. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)57982-5. ISSN 00150282.

WARD, Bonnie. Underappreciated Protein Plays Critical Role In RNA Regulation and Male Fertility. In: *Http://ucsdnews.ucsd.edu* [online]. 2016 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: http://ucsdnews.ucsd.edu/pressrelease/underappreciated_protein_plays_critical_role_in_rna_regulation_and_male_fer

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 1994, **2**(04), 371-372. DOI: 10.1017/S0967199400002240. ISSN 0967-1994.

YANAGIMACHI, R. Mechanisms of Fertilization in Mammals. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Boston, MA: Springer US, 1981, 1981, 81-182. DOI: 10.1007/978-1-4684-4016-4_6. ISBN 978-1-4684-4018-8.

YÁÑIZ, JesúsL, Sara CAPISTRÓS, Sandra VICENTE-FIEL, CarlosO HIDALGO a Pilar SANTOLARIA. A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep and pigs with a computer-assisted fluorescence method (CASA-Morph). *Asian Journal of Andrology*. 2016, **18**(6), 840–843. DOI: 10.4103/1008-682X.186877. ISSN 1008-682X.

YATSENKO, Alexander N., Derek S. O'NEIL, Angshumoy ROY, Paola A. ARIAS-MENDOZA, Ruihong CHEN, Lata J. MURTHY, Dolores J. LAMB a Martin M. MATZUK. Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZPBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. *Molecular Human Reproduction*. 2012, **18**(1), 14-21. DOI: 10.1093/molehr/gar057. ISSN 1460-2407.

YAUCH, Robert L. a Martin E. HEMLER. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochemical Journal*. 2000, **351**(3), 629-637. DOI: 10.1042/bj3510629. ISSN 0264-6021.

YESTE, Mark, Celine JONES, Siti Nornadhirah AMDANI a Kevin COWARD. Oocyte Activation and Fertilisation: Crucial Contributors from the Sperm and Oocyte. In: ARUR, Swathi, ed. *Signaling-Mediated Control of Cell Division: From Oogenesis to Oocyte-to-Embryo Development*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 213-239. DOI: 10.1007/978-3-319-44820-6_8. ISBN 978-3-319-44819-0.

YOON, Sungwon, Kyu-Tae CHANG, Hongsang CHO, et al. Characterization of pig sperm hyaluronidase and improvement of the digestibility of cumulus cell mass by recombinant pSPAM1 hyaluronidase in an in vitro fertilization assay. *Animal Reproduction Science*. 2014, **150**(3-4), 107-114. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.002. ISSN 03784320.

YU, Yang, Judy VANHORNE a Richard OKO. The origin and assembly of a zona pellucida binding protein, IAM38, during spermiogenesis. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*. 2009, **72**, 558–565. DOI: 10.1002/jemt.20696. ISSN 1097-0029.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F., G. D. ADAMSON, J. DE MOUZON, O. ISHIHARA, R. MANSOUR, K. NYGREN, E. SULLIVAN a S. VANDERPOEL. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*. 2009, **92**(5), 1520-1524. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.009. ISSN 0015-0282.